

LYSOSOMALE ENZYMAKTIVITÄT
VON MONOZYTEN/MAKROPHAGEN
NACH INKUBATION MIT
POSTPRANDIALEM FETTREICHEM SERUM
UND IHRE BEDEUTUNG IN DER ENTSTEHUNG
DER ATHEROSKLEROSE.

Kurt Henze

Diss
München
1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. N. Zöllner

LYSOSOMALE ENZYMAKTIVITÄT VON MONOZYTEN/MAKROPHAGEN NACH
INKUBATION MIT POSTPRANDIALEM FETTREICHEM SERUM UND
IHRE BEDEUTUNG IN DER ENTSTEHUNG DER ATHEROSKLEROSE.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Kurt Henze
München
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Wolfram

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	6
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Materialien	14
2.2 Versuchspersonen und Ernährungs- experiment	14
2.3 Aktivitätsmessung der Sauren Cholesteryl- ester-Hydrolase	15
2.4 N-Azetyl- β -D-Glukosaminidase	15
2.5 Cathepsin B	16
2.6 Weitere Bestimmungsmethoden	17
2.7 Herstellung von Monozyten-Makrophagen	17
2.8 Inkubation der Zellen	18
2.9 Herstellung des Zellextraktes	19
3. ERGEBNISSE	
3.1 Gewinnung von Monozyten-Makrophagen	20
3.2 Feststellung der optimalen Meßbedingungen	
3.2.1 Saure Cholesterylester-Hydrolase	20
3.2.2 N-Azetyl- β -D-Glukosaminidase und Cathepsin B	21
3.3 Einfluß einer fettreichen Mahlzeit auf Blutfette und Lipoproteine	
3.3.1 Serumcholesterin- und Triglyzerid- konzentration; Lipoproteinelektro- phorese	22
3.3.2 Lipoproteine	22
3.3.3 Apoproteine	
3.4 Einfluß der Inkubation von fettreichem post- prandialem Serum auf die Aktivität lysoso- maler Enzyme in Monozyten/Makrophagen	22

4.	DISKUSSION	23
5.	ZUSAMMENFASSUNG	29
6.	TABELLEN UND ABBILDUNGEN	30
7.	LITERATURVERZEICHNIS	40
8.	ANHANG	51

1. EINLEITUNG

Die atherosklerotischen Herz- und Gefäßkrankheiten sind die führenden Todesursachen in den Industrieländern. Durch epidemiologische Untersuchungen wurden sogenannte "Risikofaktoren" ermittelt, die das statistische Risiko von einer kardiovaskulären Erkrankung befallen zu werden, ausdrücken (2,23,24,30,31,37,40,66). Die wichtigsten Risikofaktoren sind Hyperlipoproteinämien, inhalierendes Rauchen, Hypertonie sowie die Adipositas, der Diabetes mellitus und der Bewegungsmangel.

Wegen ihrer Bedeutung als Risikofaktoren erster Ordnung spielen die Fettstoffwechselstörungen in der Pathogenese der Atherosklerose eine äußerst wichtige Rolle. Fette bilden mit Eiweißstoffen die sogenannten Lipoproteine und werden dadurch im Plasma löslich. Für das Verständnis der Fettstoffwechselstörungen ist die Nomenklatur der Lipoproteine von Wichtigkeit. Die Trennung erfolgt auf der Basis der Flotation in Salzlösungen unterschiedlicher Dichte in der Ultrazentrifuge oder der Wanderungsgeschwindigkeit in der Elektrophorese (2,65). Mit diesen Verfahren lassen sich folgende vier Gruppen unterscheiden:

Chylomikronen, Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL oder prä-Beta-Lipoproteine), Lipoproteine niedriger Dichte (LDL oder Beta-Lipoproteine) und Lipoproteine hoher Dichte (HDL oder Alpha-Lipoproteine). Diese Lipoproteine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Fett- und Eiweißzusammensetzung und sind in Bezug auf das atherogene Risiko von unterschiedlicher Bedeutung.

Die LDL sind die cholesterinreichsten Lipoproteine. Ca. 70% des Gesamtcholesterins ist Bestandteil dieser Lipoproteinfraktion. Eine erhöhte Konzentration des Gesamtcholesterins (gleichbedeutend mit Erhöhung des LDL-Cholesterins) gilt als wichtigster Risikofaktor der koronaren Herzkrankheit (2,62). Dies wird durch zahlreiche Fakten belegt:

- In epidemiologischen Untersuchungen wurde eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Serumcholesterinkonzentrationen und der Inzidenz an kardiovaskulären Erkrankungen gefunden (2,23,24,30,31,40). Ebenso besteht eine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil der gesättigten Fette in der Nahrung und den Serumcholesterinkonzentrationen sowie der Inzidenz an koronarer Herzkrankheit (2,26,38,40).
- Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie haben ein besonders hohes Koronarskleroserisiko (2).
- Patienten mit familiärer Hypobeta-Lipoproteinämie (sehr niedrige LDL-Konzentrationen) haben eine überdurchschnittlich hohe Lebenserwartung und erkranken selten an koronarer Herzkrankheit (2).
- Eine Erhöhung der LDL-Cholesterinkonzentrationen im Serum läßt sich im Primaten durch Verfütterung einer cholesterinreichen Kost experimentell erzeugen. Diese Tiere erkranken an koronarer Herzkrankheit, die sich durch Reduktion des Chole-

sterinspiegels zurückbildet (38).

- In klinischen Untersuchungen wurden Hinweise für eine morphologische Regression der Atherosklerose nach diätetischer oder medikamentöser Senkung der Serumcholesterinkonzentrationen gefunden (2,14).

Die Bedeutung der Lipoproteine hoher Dichte ist noch nicht eindeutig geklärt (2,30,62,66). Eine relativ hohe HDL-Cholesterinkonzentration im Serum geht im allgemeinen mit einer relativ geringen Prävalenz an koronarer Herzkrankheit einher: Frauen bis zur Menopause haben höhere HDL-Cholesterinkonzentrationen als Männer, bei Eskimos findet man höhere HDL-Cholesterinkonzentrationen als in anderen ethnischen Gruppen, in Familien mit hoher Lebenserwartung werden häufig besonders hohe HDL-Cholesterinkonzentrationen im Serum ermittelt. Schließlich fand man in einigen epidemiologischen Untersuchungen eine inverse Korrelation zwischen Inzidenz der koronaren Herzkrankheit und HDL-Cholesterinkonzentrationen, das heißt, je höher das HDL-Cholesterin im Serum, desto geringer ist die statistische Wahrscheinlichkeit, einen Herzinfarkt zu erleiden. Diesen epidemiologischen Befunden wurde allerdings auch widersprochen (30,62).

Obwohl eine Vielzahl von Herzinfarktpatienten mäßig oder deutlich erhöhte Serumtriglyzeridspiegel aufweisen, ist die pathophysiologische Bedeutung einer isolierten Hypertriglyzeridämie hinsichtlich des Atherosklerose-Risikos noch weitgehend unklar. Dies beruht einerseits darauf, daß eine Hypertriglyzeridämie Konzentrationserhöhungen verschiedener Lipoproteine mit unterschiedlicher atherogener Bedeutung reflektieren kann (Chylomikronen, VLDL oder "remnants") und anderer-

seits darauf, daß die Konzentrationserhöhung der triglyzeridreichen Lipoproteine das Ergebnis unterschiedlicher Störungen des Lipoproteinstoffwechsels ist, denen als solche eine unterschiedliche atherogene Bedeutung zukommt. Zur Frage, ob und welche triglyzeridreichen Lipoproteine direkt oder indirekt eine Atherosklerose begünstigen bzw. induzieren, liegen widersprüchliche Ergebnisse aus epidemiologischen und klinischen Untersuchungen vor. Der Stellenwert der Triglyzeride als Risikofaktor der koronaren Herzkrankheit wird gegenwärtig kontrovers diskutiert (2,11,12, 13,23,37).

Epidemiologische und klinische Untersuchungen weisen jedoch auf eine mögliche Bedeutung der Hypertriglyzeridämie als Risikofaktor hin:

- Eine eindeutige statistische Beziehung zwischen Hypertriglyzeridämie und der Inzidenz der koronaren Herzkrankheit wurde in einer langjährigen prospektiven Studie in Stockholm beobachtet (7,12, 13). Zwischen der Triglyzeridverteilung in Quintilen und der Todesrate an ischämischen Erkrankungen (ischämische Herz- und vaskuläre Erkrankungen) bestand eine engere Beziehung als zwischen der Cholesterinverteilung in Quintilen (oder der Verteilung anderer Risikofaktoren) und der Mortalitätsrate an ischämischen Erkrankungen.
- Eine in Finnland bei 50- bis 53-jährigen Männern durchgeführte prospektive Studie ergab, daß Serumtriglyzeride, Serumcholesterin und Zigarettenrauchen unabhängig voneinander mit der kardiovaskulären Mortalität assoziiert waren (47). Die Kombination Hypertriglyzeridämie und Adipositas war mit dem

höchsten Risiko hinsichtlich der kardiovaskulären Mortalität verbunden.

- Auch in der Tromso-Studie wurden bei Patienten, die während einer 4-jährigen Beobachtungszeit einen Herzinfarkt erlitten, signifikant höhere Triglyzeridwerte als bei Kontrollpersonen ermittelt (44,56).
- In der prospektiven Basler Studie (28) erwiesen sich die Triglyzeride als unabhängiger Risikofaktor für die periphere arterielle Verschlusskrankheit und für die koronare Herzkrankheit mit tödlichem Ausgang. Für die nichttödliche koronare Herzkrankheit stellte sich nur das Cholesterin als Risikofaktor heraus.
- In der Colestipol-Interventionsstudie bestand in der Placebogruppe bei Männern mit Triglyzeridwerten > 150 mg/dl eine deutlich höhere Mortalität an koronarer Herzkrankheit als bei Männern mit Triglyzeridwerten < 150 mg/dl (17).
- Scott et al. fanden im Rahmen einer koronarangiographischen Vergleichsuntersuchung bei Probanden mit gleichen Cholesterin-, aber steigenden Triglyzeridwerten, ein erhöhtes Risiko einer koronaren Herzerkrankung (50). In einer Autopsiestudie fanden Cabin und Roberts (11) bei einer quantitativen Bestimmung der Koronararterienstenose bei Patienten mit isolierter Hypertriglyzeridämie (Typ IV) eine ausgeprägtere Stenosierung als bei Patienten mit isolierter Hypercholesterinämie (Typ II) bzw. Normalpersonen.
- Auch eine im Cardiovascular Center in Houston durchgeführte Studie ergab eine eindeutige Korrelation

zwischen der Triglyzeridkonzentration im Blutserum und der Prävalenz einer koronarangiographisch nachgewiesenen Koronararterienstenose (23,24). Allerdings schien die Assoziation von Hypertriglyzeridämie und koronarer Herzkrankheit von einer gleichzeitig vorliegenden Hypercholesterinämie abhängig zu sein: nur bei Probanden mit Serumcholesterinwerten > 250 mg/dl nahm das Verhältnis der prozentualen Häufigkeit von Koronarkranken zu Koronargesunden mit steigenden Triglyzeridwerten deutlich zu.

Diese epidemiologischen und klinischen Hinweise konnten in anderen Untersuchungen nicht bestätigt werden (2,40).

Sämtliche epidemiologischen Untersuchungen wurden anhand von im Nüchternserum ermittelten blutchemischen Parametern durchgeführt. Zilversmit weist jedoch darauf hin, daß auch postprandiale Veränderungen in der Entstehung der Atherosklerose von Bedeutung sein könnten (64).

Jede Nahrungsaufnahme führt zu qualitativen Änderungen des Plasmalipoproteinmusters mit einem typischen zeitlichen Ablauf, der u.a. auch von der Zusammensetzung der Mahlzeit abhängt (1,2,38). Bis etwa 6 Stunden sind postprandial Chylomikronen nachweisbar. Die VLDL-Lipoproteine sind bereits 1 Stunde p.c. vermehrt und liegen noch nach 4 Stunden über dem Ausgangswert, während die HDL bis 1 1/2 Stunden vermindert sind und erst danach ansteigen.

Wichtig scheinen in der Entstehung der atherosklerotischen Läsion die Chylomikronen-remnants zu sein, die aus den postprandial im Darm entstehenden physiologischen Trägern von Nahrungsfetten, den Chylomikronen, entstehen. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Chylomikronen-remnants Cholesterin an in Kultur genommene Fibroblasten und glatte

arterielle Muskelzellen abgeben (6) und somit einer zellulären Lipidspeicherung Vorschub leisten können.

Eine zelluläre Lipidspeicherung bis hin zur Bildung einer Schaumzelle ist ein charakteristisches Merkmal der atheromatösen Läsion, die außerdem mit einer Anhäufung von komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen und der Bildung von fibrösem Gewebe mit Kalkeinlagerungen einhergeht.

Zahlreiche neuere biochemische und morphologische Untersuchungen haben aufgezeigt, daß Monozyten-Makrophagen eine bedeutende Rolle in der Atherogenese zukommt (2,21). Diese Zellen, die aus dem Blutstrom als Monozyten in die sich bildende atheromatöse Läsion einwandern, nehmen erhebliche Mengen an Plasmalipoproteinen auf und überladen sich mit Fetten, insbesondere Cholesterin und Cholesterinestern. Diese sogenannte "schaumzellige" Verfettung von Makrophagen ist ein wichtiger Teilprozeß der Atherosklerose.

Die von Monozyten-Makrophagen aus dem Blutstrom aufgenommenen Lipoproteine werden in den Lysosomen abgebaut. Eine verminderte Aktivität lysosomaler Enzyme könnte in der Entstehung der atherosklerotischen Schaumzelle durchaus eine Rolle spielen (16,59,60,61). Nach de Duve's Meinung kommt es deshalb zu einer Überladung von Cholesterinestern, weil sich die Aktivität der Sauren Cholesterylesterhydrolase einem vermehrten Einstrom von cholesterinesterhaltigen Lipoproteinen nicht in genügendem Maße anpaßt (16).

In dieser Untersuchung wurde geprüft, ob sich die lysosomale Enzymaktivität von Monozyten-Makrophagen nach Inkubation mit fettreichem postprandialem Serum ver-

ändert. Wegen ihrer möglichen Bedeutung in der Speicherung von Cholesterin und Cholesterinestern aus von der Zelle aufgenommenen Lipoproteinen wurde die Saure Cholesterylesterhydrolase und das Cathepsin B gemessen. Die Aktivität der N-Azetyl- β -D-Glukosaminidase wurde bestimmt, um festzustellen, ob auch lysosomale Enzyme eine Änderung erfahren, die nicht direkt für den intrazellulären Abbau von Lipoproteinen verantwortlich sind.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

1-¹⁴C-Cholesteryl-oleat und 1-¹⁴C-Oelsäure wurden von New England Nuclear (Dreieich) bezogen. Cholesteryl-oleat, Cystein und Mersalylsäure stammten von der Sigma Chemie GmbH (Taufkirchen), Eidotterlecithin, 4-Methylumbelliferon und Naphthylamin von Serva (Heidelberg). Die Paesel GmbH (Frankfurt) lieferte 4-Methylumbelliferyl-2-azetamido-2-deoxy-β-D-Glukopyranosid sowie Plasmagel. Von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) stammte Natriumtaurocholat, von den Behring Werken (Marburg) ORHD Serum Albumin. Brij 35 und 4-Amino-2,3-Dimethylazobenzen stammen von Merck Schuchardt (Hohenbrunn), Hank's BSS Medium (Ca- und Mg-frei) von Gibco Europe (Karlsruhe), RPMI 1640 Medium, Penicillin/Streptomycin und Ficoll-Trennlösung von der Blochrom KG (Berlin). Firma Bachem (Bubendorf, Schweiz) lieferte N- α -CBZ-L-arginyl-L-arginine-β-naphtylamide 2 acetate (Z-Arg-Arg-N Nap).

2.2. Versuchspersonen und Ernährungsexperiment

Die Untersuchungen wurden an sechs freiwilligen stoffwechselgesunden männlichen Probanden mit einem Durchschnittsalter von 36 ± 8 Jahren durchgeführt. Blut wurde nüchtern nach mindestens 12-stündiger Nahrungskarenz und 2 Stunden postprandial abgenommen. Die Zusammensetzung der fettreichen Mahlzeit zeigt Tab. 1.

2.3. Saure Cholesterylester-Hydrolase (E.C. 3.1.1.31)

Die Saure Cholesterylester-Hydrolase wurde, wie schon beschrieben (55) folgendermaßen gemessen:

Um 1 ml Substratlösung herzustellen, wurden Cholesterol-(1¹⁴C)oleate (1 μ Ci), 10 nmol Cholesterololeat und 0,8 μ mol Eigelblezithin in Benzol gemischt und zur Trockene gebracht.

Natriumtaurocholat (0,25 ml von einer 2,4 mol/l Lösung) wurde hinzugefügt und die Mischung in einem Branson Sonifier unter Eiskühlung mehrmals beschallt. 0,25 ml Rinderalbumin und 0,2 mmol/l Natriumazetat-Essigsäure-Puffer, pH 4,0, wurden hinzugefügt und sorgfältig gemischt. Die Reaktion wurde durch Beifügung von 100 μ l Substrat zu 100 μ l Zellextraktlösung gestartet. Die Inkubationsdauer betrug 1 Stunde bei 37°C.

Durch die Zugabe von 3,25 ml eiskalter Extraktionslösung (Chloroform-Methanol-Heptan 1,25:1,41:1) sowie 1 ml 0,5 mol/l Natriumkarbonat-Bikarbonat-Lösung, pH 10,5, und 30 μ l 1 mol/l NaOH wurde die Reaktion gestoppt. Nach sorgfältigem Mischen und 20 Minuten Zentrifugation bei 800 g wurde 1 ml der oberen Phase in Packard Szintillationsgläsern gefüllt und in 10 ml Bray's Lösung in einem Packard Tricarb Szintillations-Spektrometer, Modell 3375, gemessen.

Eine Lösung von radioaktiv markierter Ölsäure diente als interner Standard. Sämtliche Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.4. N-Azetyl- β -D-Glukosaminidase (E.C. 3.2.1.30)

Zur Bestimmung dieses Enzyms wurde die Methode von Peters et al. (48) modifiziert für mononukleäre Zellen durch Fowler et al. (19) verwendet.

Das Enzym wird gemessen, indem man die Menge eines fluoreszierenden Produktes (4-Methylumbelliferon) bestimmt, welches aus dem nicht fluoreszierenden Substrat (4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-Glukopyranosid) unter standardisierten Bedingungen entsteht.

100 μ l Zelleextrakt wurde für 60 Minuten bei 37°C mit 100 μ l 0,2 mmol/l 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-Glukopyranosid in 0,1 M Acetat Puffer pH 5,7 mit 0,25 mol/l Sukrose und 0,1 % Triton X 100 inkubiert.

Die Reaktion wurde gestoppt, indem man 2 ml 0,1 M NaOH-Glycin-Puffer pH 10,5, der 5 mmol/l EDTA enthält, hinzufügte. Das freigesetzte 4-Methylumbelliferon wurde in einem Eppendorf Photometer 1101 mit Fluoreszenzzusatz 1030 gemessen. Die Anregung betrug 365 nm, die Emission 430-470 nm (460 nm).

Standardkurven erhielt man, indem man 4-Methylumbelliferon mit 2 ml NaOH-Glycinpuffer pH 10,5 mischte und die Stärke der Fluoreszenz bestimmte.

2.5. Cathepsin B (E.C. 3.4.22.1)

Das Cathepsin B wurde nach der von Barrett et al. beschriebenen Methode gemessen (4).

500 μ l Zelleextraktlösung mit einem Proteingehalt von 5-15 μ g werden 1.5 ml Puffer/Aktivator-Lösung hinzugefügt und 5 Minuten bei 40°C präinkubiert. 50 μ l einer 20 mMol/l Lösung N- α -CBZ-L-arginyl-L-arginine- β -naphthylamide-2-acetat werden hinzugefügt und gemischt. Nach genau 10 Minuten werden 2 ml des Farbreagenzes hinzugesetzt. Nach 10 Minuten kann bei einer Wellenlänge von 520 nm im Fotometer abgelesen werden.

Für die Leerwerte wird der Zelleextrakt später dem Farbreagenz zugesetzt. Reagenzienleerwerte wurden ebenfalls bei jeder Bestimmungsserie gemessen. Als Standardlösung diente

eine 20 mMol/l Lösung von 2-naphthylamine HCl.

2.6. Weitere Bestimmungsmethoden

Das zelluläre Protein wurde nach der von Lowry (23) beschriebenen Methode, Serum-Cholesterin nach der vollenzymatischen Methode von Roeschlau (2,31), die Serumtriglyzeride nach der enzymatisch-kolorimetrischen Methode von Eggstein (2,3) mit dem Kit der Firma Boehringer bestimmt.

Die Lipoproteinelektrophorese erfolgte nach der von Zöllner et al. (65) beschriebenen Methode im Agarosegel.

Die Fraktionierung der Lipoproteine erfolgte durch Präzipitation und Ultrazentrifugation nach Burstein (2,10).

Die Bestimmung der Apoproteine A₁, A₂ und B erfolgte durch Immunodiffusion nach Mancini (2) mit dem Kit der Firma Serva.

2.7. Herstellung von Monozyten-Makrophagen

Die Monozyten wurden nach der Methode von Fogelman (18), wie schon beschrieben (14), gewonnen. Freiwilligen Versuchspersonen wurden 100 ml Blut abgenommen und mit 5 I.E. Heparin/ml Blut vermischt.

Das Vollblut wurde dann in 50 ml-Falcon Plastik-Röhrchen 2:1 mit Plasmagel verdünnt. Nach Sedimentation der roten Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde der aus weißen Zellen, Thrombozyten und einigen roten Zellen bestehende Überstand bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellsniederschläge wurden kombiniert und in 25 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer, pH 7,4 (Ca⁺⁺-frei), der 0,1% Rinderserum-Albumin, 12 mM Glukose und 25 mM NaHCO₃ enthielt, aufgenommen. Mit einer Plastikspritze wurde diese Zellsuspension in die Zellkammer eines Beckman Elutriators injiziert. Zu diesem Zeitpunkt war die Pumpe ausgestellt, die Rotor-

geschwindigkeit betrug 2030 Umdrehungen/Minute, die Temperatur 15°C. Dann wurden die Zellen mit 120 ml eiskaltem Puffer und einer Fließgeschwindigkeit von 7,8 ml/Minute in die Trennkammer des Beckman J 6 Elutriator-Rotors geschickt. Anschließend wurde die Zellkammer abgeklemmt und mit Fließgeschwindigkeiten von 8.9, 10.2, 11.4, 12.4, 13.4, 15, 16 und 17 ml/Minute wurden 8 Fraktionen zu je 40 ml wurden gesammelt. Die Rotor-Geschwindigkeit wurde konstant gehalten. Fraktionen 1 - 5 (Lymphozytenreich) wurden verworfen. Fraktionen 6 - 7 wurden nach Zentrifugation bei 400 g für 10 Minuten kombiniert. Es wurde festgestellt, daß die in der Trennkammer zurückbleibenden Zellen hauptsächlich aus Granulozyten bestanden. Die kombinierten Zellen wurden wiederum in 25 ml Krebs-Ringer Puffer aufgenommen und mit 15 ml Ficoll (D = 1,077), unterschichtet. Nach 40 Minuten Zentrifugation bei 400 g und Raumtemperatur wurde die milchige Zellbande mit einer Eppendorf-Plastikpipette entfernt und auf 40 ml mit Hank's BSS Medium aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde wieder bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Zelleniederschlag in RPMI 1640 Medium mit 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin aufgenommen. Ein Aliquot diente zur Zellzahlbestimmung, der Rest wurde mit RPMI/Pen-Strep auf 2×10^6 Monozyten pro 700 µl verdünnt. 700 µl der Zellsuspension wurde zusammen mit 300 µl homologem Serum in Falcon-Plastik-Kulturschalen (35 x 10 mm) gegeben.

2.8. Inkubation der Zellen

2×10^6 Monozyten in RPMI (100 µg/ml Pen-Strep) und 30% homologem Serum wurden für 24 Stunden bei 37°C und unter 5% CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag wurde eine weitere 24-Stunden-Inkubation mit RPMI 1640 Medium (100 µg/ml Pen-Strep) und 30% Nüchtern-

bzw. postprandialem Serum begonnen.

Die Inkubation wurde gestoppt, indem man die Zellen einmal mit PBS-Lösung (Ca- und Mg-frei) wusch und die Schalen bei -80°C einfrofr.

2.9. Herstellung des Zellextraktes

Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeiten bei -80°C eingefroren und anschließend in 1 ml 0,25 mol/l Sukrose, 1 mmol/l EDTA in 0,1% Äthanol nach dem in Zellkultur üblichen Verfahren aus den Schalen entfernt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Zellextrakt wurde dann bei -70°C eingefroren und in den darauffolgenden Tagen analysiert. Die Aktivität der gemessenen Enzyme war bei diesen Bedingungen bis zu mindestens einem Monat stabil.

3. Ergebnisse

3.1. Gewinnung von Monozyten-Makrophagen

Die Reinheit der mit dem "Elutriator-System" getrennten Leukozyten-Fraktionen ist in Tab. 2 dargestellt. Die Fraktionen 6 und 7 ("Monozytenfraktion"), die weiterverwendet wurden, enthalten außer Monozyten auch noch geringe Mengen an Lymphozyten und Granulozyten. Thrombozyten ließen sich in sämtlichen Fraktionen nachweisen, allerdings nur in kleiner Anzahl. Die Reinheit der gewonnenen Zellfraktion wird in Abb. 1 belegt, in der die Trennungskurve im "Coulter Counter Channalizer" abgebildet ist. Dieses Gerät trennt die Zellen der Größe nach. Es ergeben sich zwei dem Zellvolumen nach normal verteilte Zellfraktionen.

Die mit der von uns verwendeten Methode gewonnenen Monozyten verwandeln sich bei Inkubation im autologen Serum rasch in Makrophagen: schon nach wenigen Stunden setzen sie sich an der Zellkulturschale fest und nehmen zunächst ein längliches Aussehen an. Dann werden sie wieder rundlich und deutlich größer und sind im Elektronenmikroskop als Makrophagen zu identifizieren.

3.2. Feststellung der optimalen Bedingungen für die Messung der lysosomalen Enzyme in Monozyten-Makrophagen

3.2.1. Saure Cholesterylester-Hydrolase (ACEH)

Die Aktivität der ACEH war bis zu einer Proteinkonzentration von mindestens 15 µg im Meßansatz linear (Abb.2). Bei dieser Eiweißkonzentration waren 0,6% der Cholesterylester hydrolysiert. Die Zeitabhängigkeitsprüfung ergab

eine Linearität bis 120 Minuten, das ph-Optimum war 4,0. Im neutralen ph-Bereich war keine Aktivität meßbar. Die Hydrolyse des Substrates zeigte mit steigender Substratkonzentration gute Sättigung.

3.2.2. N-Azetyl- β -D-Glukosaminidase (NAGA) und Cathepsin B

Für die Messung der NAGA-Aktivität wurden folgende optimale Meßbedingungen ermittelt:

Linearität mindestens bis zu einer Eiweißkonzentration von 6 μ g Protein, Zeitabhängigkeit linear bis 60 Minuten, ph-Optimum 5,6 (Abb.3).

Für die Bestimmung des Cathepsin B verzichteten wir auf diese Untersuchungen, weil optimale Messungsmethoden für Monozyten-Makrophagen bereits veröffentlicht wurden (4).

3.3. Einfluß einer fettreichen Mahlzeit auf Blutfette und Lipoproteine

3.3.1. Serumcholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen, Lipoproteinelektrophorese.

Abb. 4 zeigt den Einfluß der verabreichten fettreichen Mahlzeit auf die Serumlipide. Die Triglyzeride steigen postprandial deutlich und signifikant an. Die Serumcholesterinkonzentrationen verändern sich hingegen nicht.

Wie durch Lipoproteinelektrophorese - die bei jedem Probanden prä- und postprandial durchgeführt wurde - gezeigt werden konnte, befinden sich im postprandialen Serum zahlreiche Chylomikronen (nicht abgebildet).

3.3.2. Lipoproteine

Wie in Tab. 3 dargestellt, finden sich die Triglyzeride in der VLDL-Fraktion postprandial signifikant erhöht. Dies ist allerdings in erster Linie auf eine Hyperchylo-mikronämie zurückzuführen. Bei der verwendeten Ultrazentrifugation-Präzipitationsmethode werden Chylomikronen und Lipoproteine sehr niedriger Dichte in einer Fraktion bestimmt. Weitere signifikante Veränderungen der Lipoproteine wurden nicht festgestellt.

3.3.3. Einfluß der fettreichen Mahlzeit auf Apoproteine

Tab. 4 zeigt den Einfluß einer fettreichen Mahlzeit auf die Apoproteine. Postprandial fanden sich die A₁-Apoproteine signifikant erhöht. Alle anderen gemessenen Apoproteine zeigten keine signifikanten Veränderungen.

3.4. Einfluß der Inkubation von fettreichem postprandialem Serum auf die Aktivität lysosomaler Enzyme

Die durch Inkubation mit prä- und postprandialen Seren verursachten Veränderungen der lysosomalen Enzymaktivitäten von Monozyten-Makrophagen sind in Abb. 4 dargestellt. Inkubation mit fettreichem postprandialem Serum verursacht gegenüber Nüchternserum eine deutliche und statistisch signifikante Veränderung sämtlicher gemessener lysosomaler Enzyme. Der Effekt ist bei der ACEH am deutlichsten, bei der NAGA am wenigsten ausgeprägt. Diese Veränderung der Enzymaktivität ist sehr zuverlässig: In jedem durchgeführten Versuch trat eine Verminderung der Enzymaktivitäten ein. LDH-Aktivität oder zelluläre Eiweißkonzentration wurden nicht beeinflusst (nicht abgebildet).

4. Diskussion

Die Reinheit der von uns gewonnenen Monozyten-Fraktionen ist mit den Resultaten anderer Untersuchungen durchaus vergleichbar (14,18).

Eine andere Möglichkeit, Lymphozyten von Monozyten zu trennen, wird ebenfalls beschrieben (8,22,34). Mononukleäre Zellmischpopulationen werden nach Trennung über einen Ficoll-Gradienten im homologen Serum für einige Stunden inkubiert. Die Monozyten setzen sich an der Zellschale fest, die anderen zellulären Elemente werden abgesaugt. Die so entstehende Zellpopulation ist jedoch nicht so rein wie die mit dem Elutriator-System getrennte: Sie enthält noch bis zu 20% sogenannte "aktivierte Lymphozyten". Da Lymphozyten und Monozyten unterschiedliche metabolische Aktivitäten haben, können sich in der Auswertung von mit solchen nicht reinen Zellpopulationen ermittelten Resultaten Probleme ergeben. Monozyten verwandeln sich bei Inkubation im autologen Serum rasch in Makrophagen und nehmen vermehrt Phagozytoseaktivität auf.

Diese besteht aus unspezifischer Phagozytose, aber auch aus Rezeptor-vermittelter Endozytose.

Das von den Makrophagen aufgenommene Material wird den Lysosomen zugeführt. Diese Zellteilchen enthalten saure Hydrolasen, die dazu dienen, die ihnen zugeführten Stoffe zu Bausteinen, wie z.B. Amino- und Fettsäuren, abzubauen und dem Zellstoffwechsel zur Verfügung zu stellen (15).

Auch die von der Zelle aufgenommenen cholesterin- und triglyzeridreichen Lipoproteine werden den Lysosomen zugeführt und dort hydrolysiert.

Lysosomen haben eine Membran und können durch Ultrazentrifugation von Zellhomogenaten isoliert werden. Die Aktivitäten der lysosomalen Enzyme werden in diesen Homogenaten gemessen.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die zellulären Membranen durch Detergenzien, Osmotischen Schock oder Beschallung zu zerstören. Im Homogenat kann dann wegen des charakteristischen pH-Optimums die Enzymaktivität der lysosomalen Enzyme ebenso bestimmt werden.

Diese Methode haben wir gewählt.

Bestimmt wurden drei lysosomale Enzyme:

N-Azetyl- β -D-Glukosaminidase (NAGA), Saure Cholesteryl-ester-Hydrolase (ACEH) und Cathepsin B.

Cathepsine, insbesondere das Cathepsin B, sind für die Trennung des Protein- vom Lipidanteil der von der Zelle aufgenommenen Lipoproteine verantwortlich. Die Apoproteine und die Lipide werden dann von anderen lysosomalen Enzymen weiter hydrolysiert (42).

Die ACEH spaltet die Fettsäuren der Cholesterinester. Diese beiden Enzyme sind für den zellulären Abbau von Lipoproteinen mitverantwortlich, während die NAGA terminale Residuen in Glykoproteinen hydrolysiert und deshalb an diesen Prozessen nicht beteiligt ist. Die Ergebnisse der optimalen Meßbedingungen stimmten mit denen anderer Untersucher gut überein, die diese Enzyme in anderen Zellarten gemessen hatten. Für die Bestimmung des Cathepsin B verzichteten wir auf diese Untersuchungen, weil optimale Messungsmethoden für Makrophagen bereits veröffentlicht wurden (4,48).

Nach Zufuhr der fettreichen Mahlzeit wurde ein Anstieg der Serumtriglyzeridkonzentrationen beobachtet.

Dieses Verhalten war nach den bekannten physiologischen Verdauungsvorgängen nach einer fettreichen Nahrungsaufnahme zu erwarten.

Wie durch Lipoproteinelektrophorese - die bei jedem Probanden prä- und postprandial durchgeführt wurde - gezeigt werden konnte, befinden sich im postprandialen Serum zahlreiche triglyzeridreiche Chylomikronen. Diese Lipoproteinpartikel werden in den Mukosazellen von Duodenum und Jejunum gebildet und dienen dem Transport der mit der Nahrung aufgenommenen und in der Darmschleimhaut resynthetisierten Triglyzeride (2,38). Die in der Darmwand synthetisierten Chylomikronen werden zunächst in die Lymphe abgegeben.

Lymph-Chylomikronen enthalten etwa 90% Triglyzeride, 5% Phospholipide, 3% Cholesterin und Cholesterinester sowie etwa 2% Protein (2,49). Hauptapolipoproteinkomponenten sind die in der Darmmukosa synthetisierten Apolipoproteine A I, A II, A IV und B 48 (27,29), während C-Apolipoproteine und Apolipoprotein E nur in geringer Konzentration vorkommen und erst sekundär im Plasma durch Interaktion mit anderen Lipoproteinen in die Chylomikronen eingebaut werden (2,29). Nach Einschleusung der Chylomikronen in das Blut über den ductus thoracicus werden diese Partikel unter Beteiligung der Lipoprotein-Lipase des Fett- und Muskelgewebes mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Minuten zu "Core-Remnants" (relativ angereichert mit Cholesterinestern und Apo E) und "Oberflächen-Remnants" (relativ angereichert mit Phospholipiden, Cholesterin und Apo C) abgebaut. Bei Stoffwechselgesunden sind demzufolge Chylomikronen im Blutserum nur nach fettreicher Mahlzeit, nicht jedoch im Nüchterzustand nachweisbar. Der Höhepunkt der Hyperchylomikronämie liegt bei Stoffwechselgesunden ca. 2 Stunden postprandial.

Chylomikronen-remnants wird eine atherogene Bedeutung zugeschrieben. In Zellkultur konnte gezeigt werden, daß sie Cholesterin und Cholesterinester (39), aber auch Neutralfette an glatte arterielle Muskelzellen und Makrophagen abgeben (35) und so der Verfettung dieser Zellen Vorschub leisten. Ein Teil der Chylomikronen-remnants wird in VLDL-, dann in IDL- und LDL-Lipoproteinpartikel umgewandelt, deren Atherogenität unbestritten ist (2,36).

Es ist noch nicht geklärt, durch welchen Mechanismus die Lysosomen in der Entstehung der Atherosklerose von Bedeutung sind. De Duve und Mitarbeiter fanden, daß bei experimenteller Atherosklerose zunächst eine Steigerung einiger lysosomaler Enzymaktivitäten der Rattenaorta zu verzeichnen war, später jedoch bei länger bestehender Atherosklerose die Aktivitäten vermindert waren (16). Er stellte die Theorie auf, daß die Lipidakkumulation die Folge einer funktionellen Verminderung der sauren Cholesterylesterase und anderer lysosomaler Hydrolasen sei, die nicht in der Lage sind, sich einem erhöhten Einstrom lipidreicher Lipoproteine effektiv anzupassen. Dieser Mechanismus könnte dann im Laufe von Jahren zur Bildung einer Zellverfettung und einer atheromatösen Schaumzelle führen. Diese Theorie wird allerdings nur teilweise durch genetisch bedingte Erbanlagen belegt. Sloan und Fredrickson beschrieben eine Frau mit genetisch bedingtem Mangel an Saurer Cholesteryl-ester-Hydrolase, die schon in jungem Alter von der schweren Atherosklerose befallen war (9). Einige Patienten mit dieser Erkrankung zeigten keine deutlich vermehrte Atherosklerose (41).

Gut belegt sind die Veränderungen der zellulären lysosomalen Enzymaktivitäten bei Diabetes mellitus. Die spezifischen Aktivitäten von Sauren Hydrolasen in der Aorta

von Streptozotocin induzierten diabetischen Ratten ist deutlich erniedrigt (60). Interessant war in diesem Zusammenhang, daß die ACEH negativ mit der Konzentration von cholesterinreichen Lipoproteinepartikeln im Serum korrelierte. Nach Insulintherapie konnten die Enzymaktivitäten normalisiert werden.

Bei Patienten mit Diabetes mellitus konnte durch Insulintherapie die Aktivität von ACEH und NAGA in frisch isolierten mononukleären Zellen gesteigert werden (32).

Insgesamt kann aus diesen Untersuchungen gefolgert werden, daß lysosomale Enzyme

- für den zellulären Abbau lipidreicher Lipoproteine notwendig sind,
- "in vitro" und "in vivo" einer Regulierung durch Serumbestandteile unterliegen,
- in atherosklerotischen Plaques eine veränderte Enzymaktivität aufweisen.

Die Resultate unserer Untersuchung zeigen, daß fettreiches Serum die lysosomale Enzymaktivität von Monozyten-Makrophagen vermindert.

Da LDH-Aktivität und Eiweißgehalt der Zelle nicht beeinflusst wurde, scheint ein allgemein verminderter Zellstoffwechsel für diese Veränderungen nicht verantwortlich zu sein.

Bei Inkubation mit lipoproteinreichem Serum strömen mehr dieser Partikel in die Zelle ein. Die Zelle sollte mit einer gesteigerten lysosomalen Aktivität auf dieses Mehrangebot von Substrat antworten.

Hingegen zeigt sich die Enzymaktivität gehemmt.

Inkubation mit fettreichem Serum führt zu einer Erhöhung

des Cholesterin-, Cholesterinester-, aber auch des Neutralfettgehaltes von Makrophagen, wie von mehreren Untersuchern gefunden wurde (5,6,46).

Es wurde gezeigt, daß Makrophagen an ihrer Zelloberfläche spezifische Rezeptoren nicht nur für die "klassischen" Lipoproteine haben. Auch denaturierte Lipoproteine werden durch Rezeptormechanismen oder unspezifisch von diesen Zellen aufgenommen (2,22,26).

Die Rezeptoraktivität für die denaturierten Lipoproteine liegt um ein Vielfaches höher als für die natürlich vorkommenden Partikel. An diesen Zellen wurden auch spezifische Rezeptoren für die cholesterinesterreichen β -VLDL-Partikel beschrieben. Diese Lipoproteine entstehen im Versuchstier bei ernährungsbedingter Hyperlipidämie (26).

Nach Inkubation mit β -VLDL ist der Cholesterin- und Cholesterinestergehalt der Zelle deutlich erhöht. VLDL ist in der Lage, die zelluläre Konzentration von Neutralfetten zu erhöhen: dies wurde in mehreren Zellarten beobachtet (22,26).

Kürzlich berichteten Bates et al., daß nach Inkubation mit VLDL die intrazellulären Triglyzeride von Makrophagen eine über 10-fach höhere Konzentration aufwiesen. Fettvakuolen konnten beobachtet werden (6).

Es ist denkbar, daß eine solche Zellverfettung durch eine Verminderung lysosomaler hydrolytischer Kapazität begünstigt wird, wie sie bei unseren Untersuchungen beobachtet wurde.

Eine fettreiche Mahlzeit könnte unter anderem durch diesen Mechanismus eine atherogene Wirkung zeigen.

5. Zusammenfassung

Die schaumzellartige Verfettung von Makrophagen stellt einen wichtigen Teilprozess der Atherosklerose dar. Die Mechanismen, die zur intrazellulären Akkumulation von Lipiden führen, sind weitgehend unbekannt. Eine zu geringe lysosomale Enzymaktivität könnte in dieser Hinsicht von Bedeutung sein.

In dieser Untersuchung wurden zunächst optimale Meßbedingungen für die lysosomalen Enzyme N-Azetyl- β -Glukosaminidase (EC Nr. 3.2.1.30), Saure Cholesterylester-Hydrolase (EC 3.1.1.31) und Cathepsin B (EC 3.4.22.1.) in Monozyten-Makrophagen ermittelt.

Sechs stoffwechselgesunden männlichen Versuchspersonen wurde eine fettreiche Mahlzeit verabreicht.

Im postprandialen Serum stiegen die Triglyzeride, die Triglyzeride in der Chylomikronen/VLDL Lipoproteinfraktion und das Apoprotein A I an. Chylomikronen wurden regelmäßig nachgewiesen. Nach Inkubation mit postprandialem lipä-mischen Serum zeigte sich die Aktivität der drei gemessenen lysosomalen Enzyme vermindert.

Besonders deutlich war dieser Effekt beim Cathepsin B und der Sauren Cholesterylester-Hydrolase, zwei Enzymen, die für den Abbau von Lipoproteinen verantwortlich sind.

Diese Resultate deuten darauf hin, daß die verminderte lysosomale Enzymaktivität für die Verfettung von Makrophagen, wie sie nach Inkubation mit fettreichem Serum beobachtet wird, von Bedeutung ist.

Tab. 1

Zusammensetzung der fettreichen Mahlzeit.
Insgesamt 2069 Kal. (8660,8 KJ). Davon
entfallen 8,9% auf EW, 68,9% auf Fett, 22,2%
auf Kohlenhydrate. Der Quotient zwischen ge-
sättigten und mehrfach ungesättigten Fett-
säuren ist 0,13.

		Eiweiß (g)	Fett (g)	Kohlenhydrate (g)
Nudeln	150 g	19,5	4,5	108,0
Butter	80 g	0,8	66,4	0
Speck, durch- wachsen	100 g	8,0	60,0	0
Parmesan- käse	50 g	18,0	23,0	2,5
		46,3	153,9	110,5

Tabelle 2

Mit dem "Flutriator-System" isolierte Leukozyten (pro 100 ml venösem Blut)

	Gesamtmenge	Granulozyten ⁺ (%)	Lymphozyten ⁺ (%)	Monozyten ⁺ (%)
Fraktion 2 + 3 (Lymphozytenfraktion)	$38 \times 10^6 \pm 8 \times 10^6$	$0,2 \pm 0,1$	98 ± 2	$0,2 \pm 0,1$
Fraktion 6 + 7 (Monozytenfraktion)	$18 \times 10^6 \pm 5 \times 10^6$	$2,5 \pm 1,3$	$5 \pm 1,3$	$93,0 \pm 6$

+ Aufgrund morphologischer Kriterien nach May-Grünwald Giemsa Färbung.

Tab. 3

Einfluß einer fettreichen Mahlzeit auf die Serumlipoproteine. Die Nüchternwerte (nü = nüchtern) wurden nach mindestens 12-stündiger Nahrungskarenz im Serum bestimmt, die postprandialen Werte (pp = postprandial) 2 Stunden nach Einnahme der Mahlzeit. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Versuchen.

	nü	pp
VLDL - Cholesterin	10,1 ± 1,9	17,3 ± 3,9
LDL - Cholesterin	133,7 ± 7,8	129,1 ± 6,5
HDL - Cholesterin	43,2 ± 4,9	44,4 ± 5,2
VLDL - Triglyzeride	31,1 ± 5,3	104,9 ± 20,3 x
LDL - Triglyzeride	30,9 ± 4,3	37,4 ± 3,2
HDL - Triglyzeride	12,2 ± 0,9	13,9 ± 1,9

(x -- Statistische Signifikanz < 0,001

Alle anderen Parameter zeigten keinen signifikanten Unterschied).

Tab.4

Einfluß einer fettreichen Mahlzeit auf einige Serumapoproteine. Die Nüchternwerte (nü = nüchtern) wurden nach mindestens 12-stündiger Nahrungskarenz im Serum bestimmt, die postprandialen Werte (pp = postprandial) 2 Stunden nach Einnahme der Mahlzeit. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Versuchen

	nü	pp	
Apoprotein B	92,2 $\pm$ 7,1	81,6 $\pm$ 6,2	
Apoprotein A ₁	133,4 $\pm$ 10,3	155,2 $\pm$ 11,5	x
Apoprotein A ₂	46,5 $\pm$ 3,2	46,6 $\pm$ 4,4	

(x -- Statistische Signifikanz $< 0,05$.
Alle anderen Vergleiche zeigten
keine Signifikanz).

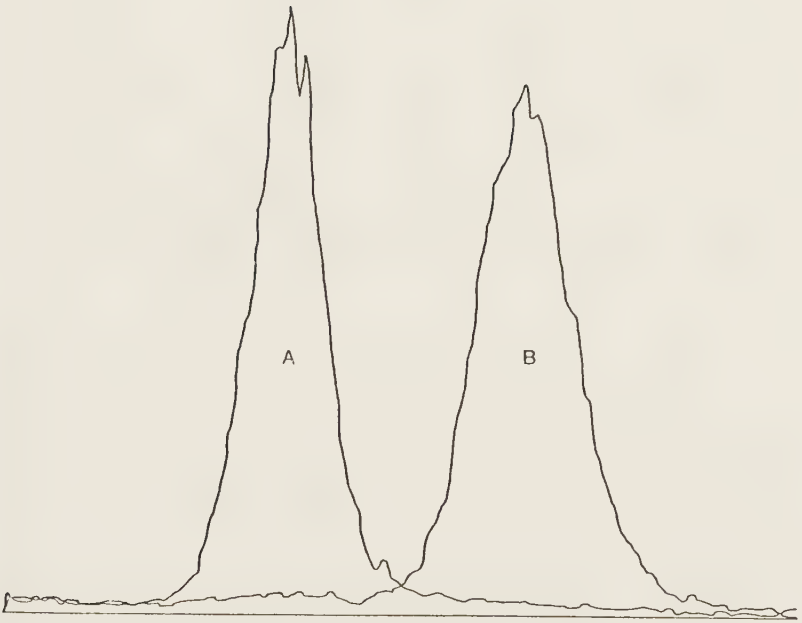


Abb. 1

Trennung der Lymphozyten und Monozyten. Fraktionen 2 und 3 ("Lymphozytenfraktion") und 6 und 7 ("Monozytenfraktion") wurden nacheinander durch den Coulter-Counter Channelizer geprüft und die beiden Verteilungskurven graphisch registriert .

A = Lymphozytenfraktion B = Monozytenfraktion

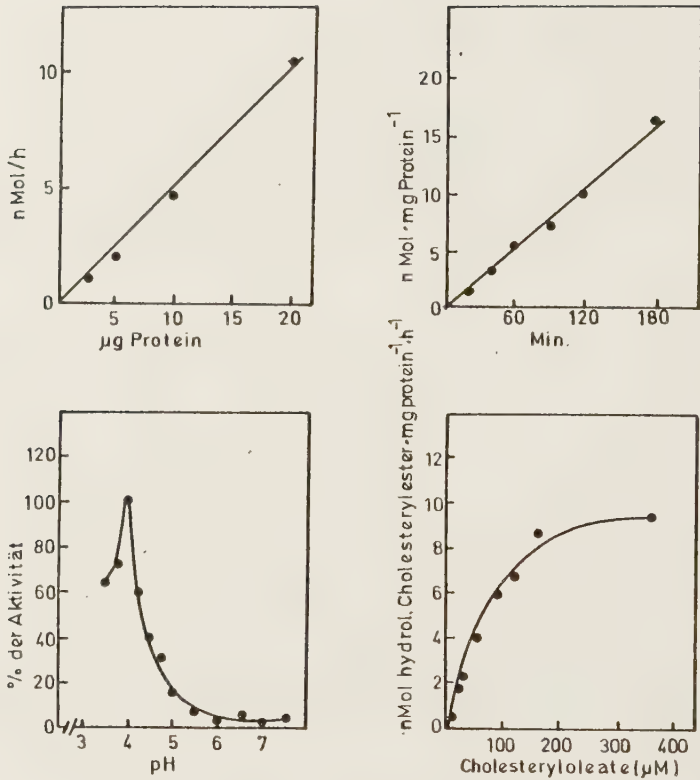


Abb. 2

Bestimmung der optimalen Meßbedingungen für die Aktivität der lysosomalen Sauren Cholesterylester-Hydrolase in Monozyten-Makrophagen.

- A) Abhängigkeit vom zellulären Protein
- B) Zeitabhängigkeit
- C) pH-Optimum
- D) Abhängigkeit von der Substratkonzentration

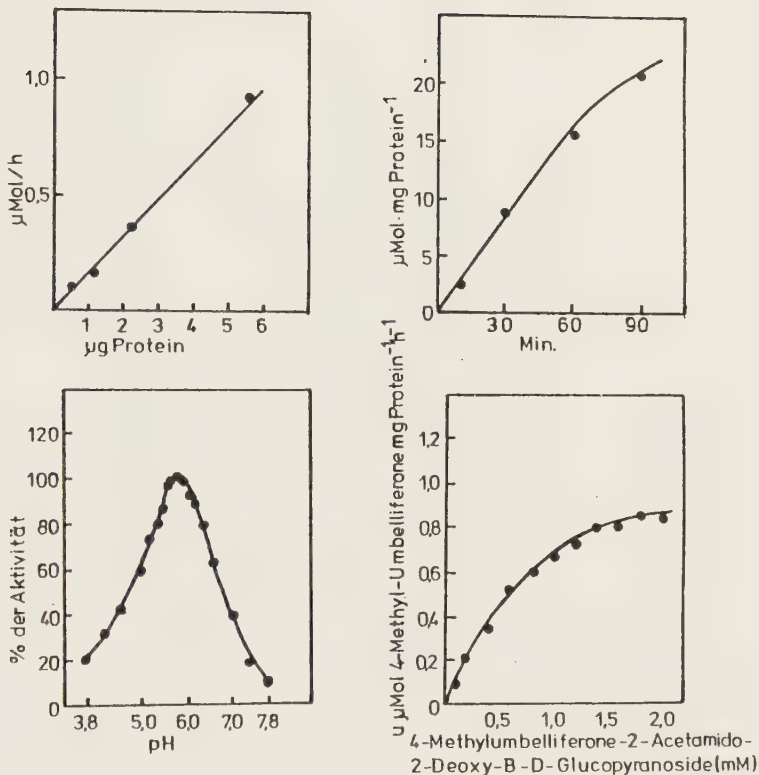


Abb. 3

Bestimmung der optimalen Meßbedingungen für die Aktivität der lysosomalen N-Azetyl-β-D-Glucosaminidase in Monozyten-Makrophagen

- A) Abhängigkeit vom zellulären Protein
- B) Zeitabhängigkeit
- C) pH-Optimum
- D) Abhängigkeit von der Substratkonzentration

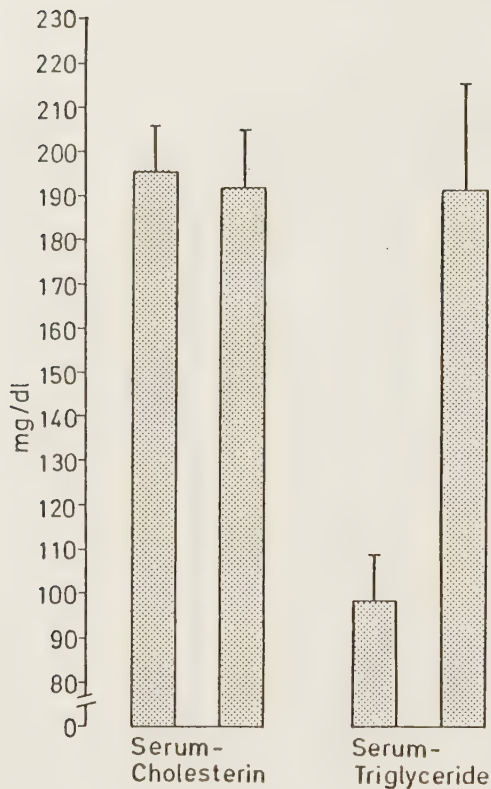


Abb. 4

Einfluß einer fettreichen Mahlzeit auf die Serumlipide. Der Nüchternwert wurde im Serum nach mindestens 12-stündiger Nahrungskarenz gemessen, der postprandiale Wert 2 Stunden nach der Einnahme der Mahlzeit.

x statistische Signifikanz

P < 0,005

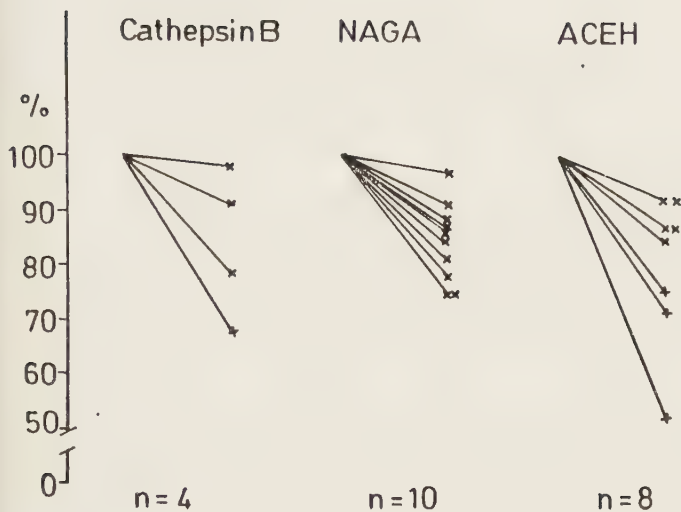


Abb. 5

Einfluß von Inkubation mit postprandialem fettreichen Serum auf die lysosomale Enzymaktivität von Monozyten-Makrophagen.

100% entspricht jeweils der Aktivitätsleistung der parallel mit Nüchternserum inkubierten Zellen.

Jeder Versuchsansatz in Doppelkulturschalen, Enzymaktivitätsbestimmungen als Doppelbestimmungen.

7. Literaturverzeichnis

1. Ahrens, E.H., Insull, W. jr., Blomstrand, R.,
Hirsch, J., Tsattas, T.T., Peterson, M.L.:
The Influence of Dietary Fats on Serum Lipid
Levels in Man.
Lancet I, 943-953, 1957
2. Assmann, G.:
Lipidstoffwechsel und Atherosklerose
Schattauer Verlag, Stuttgart, 1982
3. Bar-On, H., Roheim, P.S., Eder, H.A.:
Hyperlipoproteinemia in Streptozotocin-
treated Rats.
Diabetes 25, 509-515, 1976
4. Barrett, A.J., Kirschke, H.:
Cathepsin B, Cathepsin H and Cathepsin L.
Methods in Enzymology 535-561, 1981
5. Bates, S.R., Wissler, R.W.:
Effect of Hyperlipidemic Serum on Cholesterol
Accumulation in Monkey Medial Cells.
Bioch. Biophys. Acta 450, 78-88, 1976
6. Bates, S.R., Murphy, L.P., Fegn, Z.,
Kanazawa, T., Getz, G.S.:
Very Low Density Lipoproteins Promote Trigly-
ceride Accumulation in Macrophages.
Arteriosclerosis 4, 103-113, 1983

7. Böttiger, L.E., Carlson, L.A.:
Risk Factors for Ischaemic Vascular Death for
Men in the Stockholm Prospective Study.
Atherosclerosis 36, 389-385, 1980
8. Boyüm, A.:
Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes
from Human Blood. Isolation of Mononuclear Cells
by one Centrifugation, and of Granulocytes by
Combining Centrifugation and Sedimentation at 1 g.
Scand. J. Clin. Invest. 58, 1465-1474, 1976
9. Brecher, P., Hae Yung Pyun, Chobanian, A.V.:
Effect of Atherosclerosis on Lysosomal Chole-
sterol Esterase Activity in Rabbit Aorta.
J. of Lip. Res., 18, 154-163, 1977
10. Burstein, M., Scholnick, H.F., Martin, R.:
Rapid Methods for the Isolation of Lipoproteins
from Human Serum by Precipitation with Polyanions.
J. Lip. Res. 11, 585-589, 1970
11. Cabin, H.S., Roberts, W.C.:
Quantification of Amounts of Coronary Arterial
Narrowing in Patients with Types II and IV Hyper-
lipoproteinemia and in those with known Normal
Lipoprotein Patterns.
Am. Heart J. 101, 52-60, 1981
12. Carlson, L.A., Böttiger, L.E.:
Ischaemic Heart Disease in Relation to Fasting
Values of Plasma Triglycerides and Cholesterol.
Stockholm Prospective Study.
Lancet I, 865-870, 1972

13. Carlson, L.A., Böttiger, L.E., Ahfeld, P.E.:
Risk Factors for Myocardial Infarction in the
Stockholm Prospective Study.
Acta Med. Scand. 206, 351-355 , 1979
14. Chait, A., Henze, K., Mazzone, Th., Jensen, M.,
Hammond, W.:
Low Density Lipoprotein Receptor Activity in Freshly
Isolated Human Blood Monocytes and Lymphocytes.
Metabolism 31, 721-727, 1982
15. Dean, R.T.:
Direct Evidence of Importance of Lysosomes in De-
gradation of Intracellular Proteins.
Nature, 257, 414-416, 1975
16. de Duve, C.:
The Participation of Lysosomes in the Transformation
of Smooth Muscle Cells to Foamy Cells in the Aorta
of Cholesterol-fed Rabbits.
Acta Cardiol., 20, (Suppl.), 9-25, 1974
17. Dorr, A., Gundersen, K., Schneider, J., Spencer, T.,
Matin, W.:
Colestipol Hydrochloride in Hypercholesterolemic
Patients:
Effect on Serum Cholesterol and Mortality.
J. Chron. Dis. 31, 5-12, 1978
18. Fogelman, A.M., Seagers, J., Hokom, M.,
Edwards, P.A.:
Separation of and Cholesterol Synthesis by Human
Lymphocytes and Monocytes.
J. Lip. Res. 20, 379-388, 1979

19. Fowler, S., Shio, H., Wolinsky, H.:
Subcellular Fractionation and Morphology of Calf
Aortic Smooth Muscle Cells.
J. Cell Biol. 75, 166-184, 1977
20. Gatton, E., Wolman, W.:
The Role of Smooth Muscle Cells and Hematogenous
Macrophages in Atheroma.
J. Path. 123, 123-131, 1977
21. Gerrity, R.G.:
The Role of the Monocyte in Atherogenesis. Tran-
sition of Blood-Borne Monocytes into Foam Cells in
Fatty Lesions.
Am. J. Path. 25, 181-190, 1981
22. Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Brown, M.S., Innerarity, T.L.,
Mahley, R.W.:
Cholesterol Ester Accumulation in Macrophages Result-
ing from Receptor-Mediated Uptake and Degradation
of Hypercholesterolemic Canine β -Very Low Density
Lipoproteins.
J. Biol. Chem. 225, 1839-1848, 1980
23. Gotto, A.M., Gorry, G.A., Thompson, J.R., Cole, J.S.,
Trost, R., Yeshurun, D., De Baake, M.E.:
Relationship between Plasma Lipid Concentrations
and Coronary Artery Disease in 496 Patients.
Circulation 56, 875-882, 1977

24. Gotto, A.M., In:
Status Report: Plasma Lipids, Lipoproteins and
Coronary Heart Disease.
In: Atherosclerosis Review, 4, Paoletti, R., Gotto,
A.M.,
jr. Hrsg.), Raven Press, New York, 17, 1978
25. Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, M.C.,
Kannel, W.B., Dawber, T.R.:
Diabetes, Blood Lipids and the Role of Obesity in
Coronary Heart Disease Risk for Woman.
Ann. Int. Med. 87, 393-399, 1977
26. Grundy, S.M., Ahrens, E.H. jr.:
The Effects of Unsaturated Dietary Fats on Absorption,
Excretion, Synthesis and Distribution of Cholesterol
in Man.
J. Clin. Invest. 49, 1135-1152, 1970
27. Grundy, S.M., Mok HYI.:
Chylomicron Clearance in Normal and Hyperlipidemic
Man.
Metabolism 25, 1225-1229, 1976
28. Hartmann, G., Stähelin, H.B.:
Hyperlipidämie und Atherosklerose in der Schweiz:
Ergebnisse aus der Basler Studie.
Therapeutische Umschau 37, 980-983, 1981
29. Hazzard, W.R., Bierman, E.L.:
Broad β -Disease versus Endogenous Hypertriglyceridemia:
Levels and Lipid Composition of Chylomicrons and Very
Low Density Lipoproteins during Fat-free Feeding and
Alimentary Lipemia.
Metabolism 24, 817-821, 1975

30. Henze, K.:
Blutfette - Risikobeurteilung
Öff. Gesundh. Wesen 43, 423-425, 1981
31. Henze, K., Wallmüller-Strycker, A., Bauer, M.,
Barth, Ch., Wolfram, G., Zöllner, N.:
Cholesterin und Triglyzeride im Serum einer Münch-
ner Bevölkerungsgruppe. Beziehungen zu Alter und
Geschlecht.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 1013-1019, 1981
32. Henze, K., Chait, A.:
Use of Circulating Mononuclear Cells to study the
Effect of Metabolic Changes on Lysosomal Enzyme
Activities and Low Density Lipoprotein Receptors:
Effect of Insulin Therapy in Diabetic Patients.
Diabetologia 20, 625-629, 1981
33. Ho, Y.K., Brown, M.S., Bilheimer, D.W., Goldstein, J.L.:
Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Activi-
ty in Freshly Isolated Human Lymphocytes.
J. Clin. Invest 58, 1465-1474, 1976
34. Ho, Y.K., Brown, M.S., Goldstein, J.L.:
Hydrolysis and Excretion of Cytoplasmic Cholesteryl
Esters by Macrophages: Stimulation by High Density
Lipoprotein and Other Agents.
J. Lipid. Res. 21, 391-398, 1980
35. Howard, B.V.:
Uptake of Very Low Density Lipoprotein Triglyceride
by Bovine Aortic Endothelial Cells in Culture.
J. Lip. Res. 18, 561-571, 1977

36. Innerarity, Th. L., Pitas, R.E., Mahley, R.W.:
Modulating Effects of Canine High Density Lipoproteins on Cholesteryl Ester Synthesis Induced by B- Very Low Density Lipoproteins in Macrophages. *Arteriosclerosis* 2, 114-124, 1982
37. Kannel, W.B., Sorlie, P., Brand, F., Castelli, W.P., Mc Namara, P.M., Gherardi, G.J.:
Epidemiology of Coronary Atherosclerosis: Postmortem vs. Clinical Risk Factor Correlations. The Framingham Study.
Atherosclerosis V, edited by Gotto, A.M. jr., Smith, L.C., Allan, B.
Springer Verlag Berlin, 1980
38. Karoff, Ch., Assmann, G.:
Diät, Lipoproteine und Arteriosklerose.
Münch. Med. Wschr. 122, (Suppl. 5), 251-262, 1980
39. Kenagy, D.R., Floren, C.H., Bierman, E.L., Kudchodkar, B., Albers, J.J.:
Cholesterol Homeostasis of Skin Fibroblasts after Incubation with Postabsorptive and Postprandial Lipoproteins. The Effect of a Fatty Meal.
Arteriosclerosis 2, 290-295, 1982
40. Key, A.:
Coronary Heart Disease - The Global Picture
Atherosclerosis 22, 149-192, 1975
41. Kritschewsky, D., Kothari, H.V.:
Arterial Enzymes of Cholesteryl Ester Metabolism.
Adv. Lipid Res. 16, 221-266, 1978

42. Leake, D.S., Peters, T.J.:
Proteolytic Degradation of Low Density Lipoproteins
by Arterial Smooth Muscle Cells. The Role of Indi-
vidual Cathepsins.
Biochim. Biophys. Acta 664, 108-116, 1981
43. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, J.R.:
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951
44. Miller, N.E., Forde, O.H., Thelle, D.S., Mjos, O.D.:
The Tromso Heart Study. High Density Lipoproteins
and Coronary Heart Disease: A Prospective Case-Control-
Study.
Lancet I, 965-1002, 1977
45. Muir, E.M., Bowyer, D.E.:
Inhibition of Pinocytosis and Induction of Release
of Lysosomal Overload of Arterial Smooth Muscle
Cells in vitro.
Atherosclerosis 50, 85-92, 1984
46. Oram, J.F., Shafrir, E., Bierman, E.L.:
Triacylglycerol Metabolism and Triacylglycerol
Lipase Activities of Cultured Human Skin Fibro-
blasts.
Biochim. Biophys. Acta 619, 214-227, 1980
47. Pelkonen, R., Nikkilä, E.A., Koskinen, S., Penttinen, K.,
Sarna, S.:
Association of Serum Lipids and Obesity with Cardio-
vascular Mortality.
Brit. Med. J. 2, 1185-1202, 1977

48. Peters, T.J., Müller, M., de Duve, C.:
Lysosomes of the Arterial Wall. I. Isolation
and Subcellular Fractionation of Cells from
Normal Rabbit Aorta.
J. Exp. Med. 136, 1117-1139, 1972
49. Redgrave, T.G.:
Formation of Cholesteryl Ester-rich Particulate
Lipid during Metabolism of Chylomicrons.
J. Clin. Invest. 49, 465-469, 1970
50. Scott, D.W., Gotto, A.M., Cole, J.S., Gorry, G.A.:
Collateral Risk Factors in Coronary Artery Di-
sease - A Study of 371 Males with Chest Pain.
J. Chron. Dis. 34, 337-415, 1978
51. St. Clair, R.W., Greenspan, P., Leight, M.:
Enhanced Cholesterol Delivery to Cells in Culture
by Low Density Lipoproteins from Hypercholesterolemic
Monkeys. Correlation of Cellular Cholesterol
Accumulation with Low Density Lipoprotein Molecular
Weight.
Arteriosclerosis 3, 77-86, 1983
52. Stein, O., Vanderhoek, J., Stein, Y.:
Cholesterol Ester Accumulation in Cultured Aortic
Smooth Muscle Cells.
Atherosclerosis 26, 465-482, 1977
53. Stein, Y., Friedman, G., Stein, O.:
Intralysosomal Accretion of Cholesterol Ester in
Vascular Cells in Culture and its Translocation
into the Cytoplasm.
Atherosclerosis Review, 3, 97-108, 1978

54. Stein, Y., Halperin, G., Stein, O.:
Intralysosomal Hydrolysis of Cholesterol Esters
of Varying Fatty Acid Composition in Cultured
Human Skin Fibroblasts.
Biochim. Biophys. Acta, 530, 420-427, 1978
55. Takano, T., Black, W.J., Peters, T.J., de Duve, C.:
Assay Kinetics, and Lysosomal Localization of an
Acid Cholesteryl Esterase in Rabbit Aortic Smooth
Muscle Cells.
J. Biol. Chem. 249, 6732-6737, 1974
56. Vik. T., Try, K., Thelle, D.S., Forde, O.H.:
Tromso Heart Study: Vitamin D Metabolism and
Myocardial Infarction.
Brit. Med. J. 2, 176-182 , 1979
57. Wilhelmsen, L., Wedel, H., Tibblin, G.:
Multivariate Analysis of Risk Factors for Coronary
Heart Disease.
Circulation 48, 950-972, 1973
58. Windaus, A.:
Über den Gehalt normaler und atheromatöser Aorten
an Cholesterin und Cholesterinestern.
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 67, 174-177, 1910
59. Wolinsky, H., Goldfisher, S., Schiller, B.:
Lysosomes in Aortic Smooth Muscle Cells: Effects
of Hypertension.
Am. J. Pathol. 73, 727-734, 1973

60. Wolinsky, H., Goldfisher, S., Capron, L.:
Hydrolase Activities in the Rat Aorta. Effects
of Diabetes Mellitus and Insulin Treatment.
Circ. Res. 42, 821-830, 1978
61. Wolinsky, H., Fowler, S.:
Participation of Lysosomes in Atherosclerosis.
New. Engl. J. Med. 23, 1173-1178, 1978
62. Wolfram G., Schlierf, G.:
LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin Risikofaktor
und Schutzfaktor.
Internist 20, 613-618, 1979
63. Zilversmit, D.B.:
Mechanisms of Cholesterol Accumulation in the
Arterial Wall.
Am. J. Cardiol. 35, 559-562, 1975
64. Zilversmit, D.B.:
Role of Triglyceride-rich Lipoproteins in Athero-
genesis.
Ann. NY Acad Sci 275, 138-146, 1976
65. Zöllner, N., Gröbner, W., Berger, Ch., Wolfram, G.:
Elektrophoretische Trennung der Serumlipoproteine
im Agarosegel mit Albuminzusatz.
Z. klin. Chem. klin. Bioch., 7, 525-529, 1969
66. Zöllner, N.:
Cholesterinspiegelsenkung - warum und womit
Deutsches Ärzteblatt, 4, 199-204, 1979

Danksagung

Für die Überlassung des Themas,
die anregenden Diskussionen und
stete Unterstützung möchte ich
Herrn Prof. Dr. N. Zöllner und
Herrn Prof. Dr. G. Wolfram
herzlich danken.

Lebenslauf

Kurt Henze, geb. am 20.3.1949 in Greven/Westfalen
als Sohn des Dr. Anton Henze und seiner Ehefrau
Elisabeth, geb. Niebuer.

1955 - 1959 Volksschule St. Martin in Greven/Westf.

1959 Umzug nach Rom/Italien

1959 - 1969 Besuch der Deutschen Schule Rom

1969 Abitur an der Deutschen Schule Rom

1969 - 1975 Studium der Humanmedizin an der
"Universita degli Studi" in Rom

1975 Promotion zum Doktor der "Medizin und
Chirurgie" an derselben Universität
und Approbation als Arzt

1976 - 1984 Wissenschaftlicher Assistent an der
Medizinischen Poliklinik der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Zwischenzeitlich Stipendiat an der
"University of Washington" in
Seattle/USA

